



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **54113** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61B 5/145

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ ФУКОЗИЛЬОВАНOSTІ ФІБРОНЕКТИНУ

1

2

(21) u201005446

(22) 05.05.2010

(24) 25.10.2010

(46) 25.10.2010, Бюл. № 20, 2010 р.

(72) КУЛІНІЧ АННА ОЛЕКСАНДРІВНА, ШЕВЦОВА
АЛЛА ІВАНІВНА, МАСЛАК ГАННА СЕРГІЇВНА,
ПИСЬМЕНЕЦЬКА ІРИНА ЮРІЇВНА(73) ДНІПРОПЕТРОВСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА
АКАДЕМІЯ(57) Спосіб визначення ступеня фукозильованості
фібронектину плазми крові людини, що включає
проведення адсорбції антитіл в імуноферментно-
му планшеті, блокування вільних сайтів зв'язуван-

ня, внесення зразків плазми крові, з подальшим
додаванням фукозоспецифічного лектину і вне-
сення субстрату, який **відрізняється** тим, що на
стадії адсорбції використовують деглікозильовані
моноспецифічні поліклональні антитіла до фібро-
нектину, для блокування використовують твін-
фосфатний буфер, що містить 10 мг/мл сухого
молока, плазму вносять у розведенні 1:1000, для
визначення кінцевих залишків фукози використо-
вують лектин *Laborum anagyioides agglutinin*
(LABA), кон'югований з пероксидазою кореня хро-
ну.

Корисна модель відноситься до біології і ме-
дицини, а саме до способів визначення глікозу-
вання глікопротеїнів, зокрема, для визначення
ступеня фукозильованості фібронектину (ФН)
плазми крові людини, що може бути використано у
лабораторній діагностиці різноманітних патологіч-
них станів.

Відомим способом дослідження глікозування
глікопротеїнів є визначення сialьованості фібро-
нектину за допомогою лектин-ферментного аналі-
зу [Hampel D.J., Köttgen B., Dudenhausen J.W.,
Köttgen E. Fetal fibronectin as a marker for an
imminent (preterm) delivery. A new technique using
the glycoprotein lectin immunosorbent assay //
Journal of Immunological Methods. - 1999. - Vol. 224
- P. 31-42], який включає сорбцію десіальованих
антитіл до фібронектину у лунках полістиролового
планшету, внесення у лунки планшету досліджу-
ваних зразків плазми крові, що попередньо оброб-
лені латексними кульками та доведені до концен-
трації фібронектину 5 г/л, внесення
сialоспецифічного лектину *Sambucus nigra*
agglutinin (SNA) або *Maackia amurensis agglutinin*
(MAA), кон'югованого з біотином, внесення стреп-
тавідину, кон'югованого з пероксидазою кореню
хрону. Недоліками описаного способу є викорис-
тання на першому етапі десіальованих антитіл до
фібронектину, отриманих шляхом окиснення тер-
мінальних залишків олігосахаридних структур за
допомогою періодату натрія, що обмежує можли-
вості подальшого аналізу вуглеводних структур у
складі досліджуваного глікопротеїну та знижує

його специфічність; попередня обробка зразків
латексом ускладнює аналіз; відсутність контроль-
них (калібрувальних) зразків зменшує достовір-
ність кількісної оцінки результатів.

Відомий спосіб визначення вуглеводних дете-
рмінант альфафетопротейну за допомогою лектин-
ферментного аналізу [Tamano K., Sugiura M.,
Natsuki J., Sawakami-Kobayashi K., Tajima H.,
Machida M. Improvement of the lectin-antibody
enzyme immunoassay of the alphafetoprotein
carbohydrate chain for automation with the enzyme
immunoassay robot // Biosci. Biotechnol. Biochem. -
Vol. 69, N 8 - 2005 - P. 1616-1619], який включає
використання парамагнітних кульок для сорбції
антитіл, лектину Concanavalin A (ConA) для
блокування вуглеводних структур у складі ан-
титіл, внесення дослідних зразків та інкубування з
лектинами. Для визначення фукозильованості та
наявності корових три-манозидних структур N-
гліканів використовували лектини *Lens culinaris*
agglutinin (LCA) та ConA. Перевагами даного ме-
тоду є використання ConA для блокування вугле-
водних детермінант антитіл, що значно знижує
наявність неспецифічних взаємодій та застосу-
вання автоматичної системи для здійснення аналі-
зу. Недоліками даного методу є: використання
парамагнітних кульок значно ускладнює аналіз та
потребує спеціального обладнання (фотонна ка-
мера ARGUS, Hamamatsu Photonics, Japan); від-
сутність етапу блокування вільних сайтів зв'язу-
вання на парамагнітних кульках може привести до
появи фонового забарвлення.

(13) **U**
(11) **54113**
(19) **UA**

Найбільш близьким до запропонованого способу визначення ступеня фукозильованості фібрoneктину є спосіб визначення фукозильованості альфа-1-кислого глікопротеїну [Ryden I., Lundblad A., Pahlsson P. Lectin ELISA for analysis of α_1 -acid glycoprotein fucosylation in the acute phase response // *Clinical Chemistry*. - 1999. - Vol. 45, N11. - P. 2010-2012], який містить наступні етапи: 1- адсорбція поліклональних антитіл до альфа-1-кислого глікопротеїну протягом 12 годин при 4°C та наступне чотирьохразове відмивання промивним розчином, який містить 9 г/л NaCl та 7,5 г/л твіну; 2 - блокування лунок планшету впродовж 60 хвилин 200 мкл 0,1 М фосфатного буфера, що містить 50мг/мл бичачого сироваткового альбуміну при кімнатній температурі з наступним відмиванням; 3 - внесення по 100 мкл зразків плазми, розведених в 200 раз та інкубація 60 хвилин при кімнатній температурі, промивка; 4 - додавання до лунок фукозоспецифічного лектину *Aleuria aurantia* (AAL) кон'югованого з біотином та інкубація впродовж 60 хвилин з наступним відмиванням; 5 - додавання екстравiдину кон'югованого з лужною фосфатазою та інкубація впродовж 60 хвилин, промивка; 6-внесення субстрату і реєстрація кольорової реакції при довжині хвилі 405 нм.

Недоліками прототипу, які можуть перешкодити досягненню очікуваного технологічного результату є: 1) вуглеводні компоненти іммобілізованих імуноглобулінів можуть давати неспецифічну реакцію; 2) використання для блокування бичачого сироваткового альбуміну, який також містить вуглеводні детермінанти може збільшувати фонове забарвлення; 3) розведення плазми 1:200 може спричинити неспецифічні реакції через перенасичення розчину іншими білками; 4) визначення фукозильованості білку за наведеною формулою з урахуванням лише розведення плазми крові є неточним, так як концентрація досліджуваного білку, а отже і фукозних залишків у всіх зразках неоднакова; 5 - аналіз багатостадійний, що підвищує вірогідність неспецифічних реакцій та впливає на достовірність отриманих даних.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу визначення фукозильованості ФН шляхом формування нового набору та співвідношення головних компонентів - очищених деглікозильованих антитіл до фібрoneктину, лектину *Laborum anagyriodes agglutinin* (LABA) кон'югованого з пероксидазою кореня хрону, дослідних зразків і компонентів буфера для блокування та промивки, що дозволить пристосувати його для оцінки фукозильованості саме ФН, спростити аналіз, підвищити відтворюваність отриманих даних. Згідно запропонованого способу, олігосахаридні ланцюги ФН, іммобілізованого через шар деглікозильованих антитіл на поверхні полістиролу, взаємодіють з вуглеводзв'язуючими ділянками лектину LABA, кон'югованого з пероксидазою хрону, ступінь подібної взаємодії оцінюється за кількістю окисненого пероксидазою субстрату шляхом вимірювання на мікропланшетному рідері світлопоглинання забарвлених продуктів реакції.

Поставлена задача вирішується тим, що у запропонованому способі визначення ступеня фуко-

зильованості фібрoneктину, що включає проведення адсорбції антитіл в імуоферментному планшеті, блокування вільних сайтів зв'язування, внесення зразків плазми крові, з подальшим додаванням фукозоспецифічного лектину і внесення субстрату, згідно корисної моделі на стадії адсорбції використовують деглікозильовані моноспецифічні поліклональні антитіла до фібрoneктину, для блокування використовують твін-фосфатний буфер, що містить 10 мг/мл сухого молока, плазму вносять у розведенні 1:1000, для визначення кінцевих залишків фукози використовують лектин *Laborum anagyriodes agglutinin* (LABA) кон'югований з пероксидазою кореня хрону.

Між сукупністю основних ознак способу, що пропонується, і технічним результатом, який може бути досягнутий, виявляється наступний причинно-наслідковий зв'язок: використання деглікозильованих антитіл дозволяє безпосередньо вносити до лунок планшету досліджувану плазму у підбраному робочому розведенні, що значно спрощує підготовку зразків до аналізу та є найбільш оптимальним для виявлення вірогідної різниці в ступені фукозильованості фібрoneктину; проведення адсорбції деглікозильованих антитіл до фібрoneктину 100 мкл з концентрацією 0,5 мкг/мл при температурі 4°C протягом 12 годин дозволяє отримати рівномірний шар антитіл на поверхні лунок планшету; блокування вільних сайтів зв'язування додаванням фосфатного буфера, що містить 10 мг/мл сухого молока та 0,1 % твіну-80 протягом 1 години забезпечує повне перекриття всіх вільних валентностей лунки та запобігає появі неспецифічних взаємодій; подальше внесення в лунки фукозоспецифічного лектину, кон'югованого з пероксидазою хрону, в об'ємі 100 мкл при концентрації 50 мкг/мл дозволяє визначати кінцеві залишки фукози у складі фібрoneктину.

Приклад.

В лунки імуоферментного планшету (Microtest Plate 96, Sarstedt) вносять по 100 мкл деглікозильованих антитіл до фібрoneктину з концентрацією 0,5 мкг/мл в 0,1 М натрій-карбонат-бікарбонатному буфері (pH=9,5) та проводять адсорбцію при температурі 4°C протягом 12 годин, промивають 0,1 % твін-фосфатним буфером (ТФБ). Блокують вільні сайти лунок планшету протягом 1 години при кімнатній температурі додаванням 200 мкл ТФБ, що містить 10 мг/мл сухого молока. Потім проводять чотирьохразову, по 10 хвилин за кожним разом, промивку лунок планшета 200 мкл ТФБ.

Вносять зразки досліджуваної плазми крові, що розведені в 1000 раз у 0,1 М фосфатному буфері (pH=7,4) по 100 мкл в лунку, проводять інкубацію при температурі 4°C впродовж 12 годин. У контрольні лунки вносять по 100 мкл того ж буферного розчину, у лунки калібратора вносять по 100 мкл пулу плазми 10 здорових донорів після чого повторюють чотирьохразову, по 10 хвилин за кожним разом, промивку лунок планшета ТФБ.

На наступному етапі вносять по 100 мкл лектину кори золотого дощу, кон'югованого з пероксидазою хрону (LABA-HRP, BioRad), що розведений до концентрації 50 мкг/мл у ТФБ і містить 1

ммоль/л CaCl_2 і MgCl_2 . Інкубацію проводять 2 години при кімнатній температурі. Після стандартної промивки ТФБ в лунки вносять по 50 мкл субстратної суміші: 0,0004 М ТМБ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Acros Organics) в 0,1 М ацетатному буферному розчині (pH=6,0), що містить 1 % DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma) та 0,01 % перекису водню. Через 10 хвилин зупиняють реакцію внесенням до лунок по 50 мкл 2 М сірчаної кислоти (H_2SO_4) та вимірюють оптичну густину при довжині хвилі 450 нм на мікропланшетному рідері. Ступінь фукозильованості визначають за ступенем зв'язування ФН з лектином *Laborum anagyroides lectin* у порівнянні з нормою у перерахунку на 1 мкг даного білку.

Сукупність ознак запропонованого способу визначення ступеня фукозильованості фібронектину є суттєвою, оскільки відповідає очікуваному технічному результату. Наведені твердження інформують про те, що запропонована корисна модель відповідає критерію «новизна», тому що дійсним чином не витікає з існуючих варіантів імуноферментного аналізу.

Відомості, що підтверджують можливість використання заявленого способу з досягненням вищевказаного технічного результату наведені нижче.

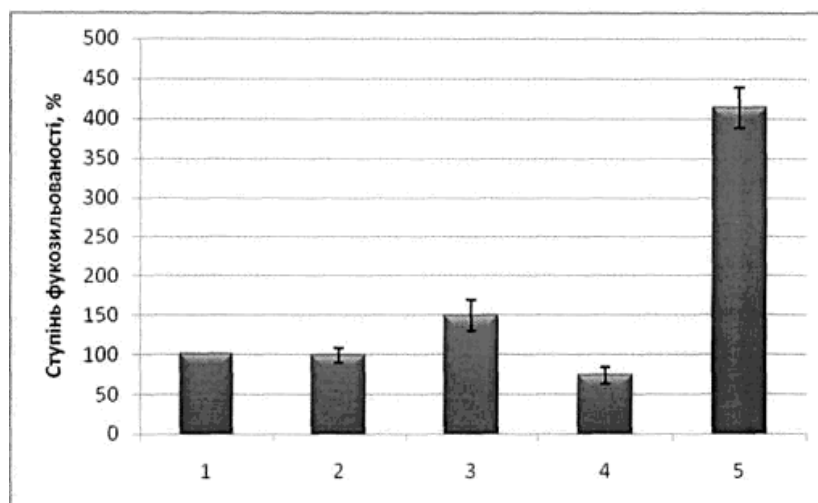
Для перевірки вищевказаного технічного результату запропонованим способом визначали ступінь фукозильованості фібронектину за ступенем зв'язування з лектином *Laborum anagyroides lectin* при різних патологічних станах (Фіг.) - гострому Q-інфаркті міокарду (2), еритремії(3), сублей-

кемічному мієлозі (4) та хронічних гепатитах В і С (5). Результати вимірювання, що представлені на Фіг. показали, що у хворих з гострим Q-інфарктом міокарду ступінь фукозильованості ФН практично не змінюється (від норми 1), при еритремії підвищується на 49,7 %, а при сублейкемічному мієлозі знижується на 25,9 %. Найбільше підвищення фукозильованості ФН, у 4 рази, виявлено у хворих з хронічними гепатитами В і С. Враховуючи специфічність лектину *Laborum anagyroides lectin*, можна зробити висновок, що при патологічних процесах вірусного походження внаслідок дії відповідної фукозилтрансферази збільшується вміст кінцевих залишків фу кози у положенні 1→2.

Запропонований спосіб визначення ступеня фукозильованості фібронектину характеризується високою чутливістю, специфічністю, простотою і доступністю реагентів і може бути використаний як в клінічних, так і в науково-дослідних лабораторіях.

Технічний результат, що досягається при використанні корисної моделі, визначається використанням комбінації деглікозильованих антитіл та лектину, кон'югованого з пероксидазою хрому, що дозволяє значно підвищити специфічність та відтворюваність лектин-ферментного аналізу в порівнянні з запропонованими раніше способами.

Розроблений спосіб відповідає умові «промислова придатність», що дозволяє кваліфікувати його як «корисну модель», яка може бути використана у лабораторній діагностиці різноманітних патологічних станів.



Фіг.